

GenVinSet

HLA CELIAC PLUS

Návod k použití

Kit for detection of alleles
associated to Celiac Disease

Product code GVS-DQP-48 (48 test)
GVS-DQP-24 (24 test)

Store from -18 to -30°C



Rev. 02 / 2020-10-15



Blackhills Diagnostic Resources, S.L.
Camino del Pilón 86, Casa 7 Local. 50011- Zaragoza -Spain
www.blackhillsdiagnostic.com

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Použití | 3 |
| Souhrn a vysvětlení | 4 |
| Principy postupu | 6 |
| Obsah soupravy | 7 |
| Skladování soupravy | 8 |
| Materiál potřebný, ale nedodávaný | 9 |
| Odběr vzorku a příprava | 10 |
| Použití | 11 |
| A) Příprava PCR | |
| B) Konfigurace termocyklieru | |
| Výsledky | 13 |
| Kontrola kvality | 17 |
| Specifická pracovní data | 18 |
| Alely detekované pomocí GENVINSET HLA CELIAC PLUS (IMGT-HLA 3.37.0) | 20 |
| Omezení metody | 22 |
| Řešení problémů | 23 |
| Odkazy | 25 |
| Poznámky odběrateli | 27 |
| Změny oproti verzi 1 | 28 |
| Vysvětlení použitých symbolů a značek | 29 |

Použití:

GENVINSET HLA CEELIC PLUS je souprava pro detekci alel DQB1*02; DQB1*03:02; DQA1*05:01 a DQA1*03:01 HLA systému a následného stanovení DQ2 a DQ8 antigenů asociovaných s onemocněním celiakií. Pro HLA-DQB1*02 je možné stanovit status vzorku jako homozygotní nebo heterozygotní. Analýza je založená na metodě PCR za použití technologie prób TaqMan[®].

Souhrn a vysvětlení

Onemocnění celiakie je malabsorpční onemocnění způsobené kombinací genetických faktorů a životního stylu. Faktorem životního stylu, který napomáhá vývoji onemocnění je gluten a příbuzné proteiny v obilovinách jako je pšenice, ječmen, žito, které způsobují chronické zánětlivé procesy v membráně střeva se symptomy jako průjem, steatorea a váhový úbytek [1, 2].

Je jedním z nejčastějších onemocnění v kavkazské populaci s prevalencí 1:100 v Evropě a 1:500 v severní Americe [3].

Sklony k přecitlivělosti na gluten jsou zčásti geneticky podmíněné. Silná predispozice je svázaná s alelami HLA-DQ, kódujícími α a β řetězce dvou molekul hlavního histokompatibilitního systému (MHC) třídy II [2-4].

Ve většině studovaných populací je 90-95% pacientů nosičem heterodimeru HLA-DQ2 kódovaným alelami DQA1*05 a DQB1*02 v pozici cis (běžnější ve střední a severní Evropě nebo trans (běžnější ve středozemní populaci). Riziko projevů onemocnění je 50krát vyšší u jedinců s heterodimerem DQA1*05:01-DQB1*02:01 oproti běžné populaci, nicméně přítomnost dimeru ještě nepotvrzuje onemocnění, neboť se objevuje i u části obecně zdravé populace) [5, 9, 11-13].

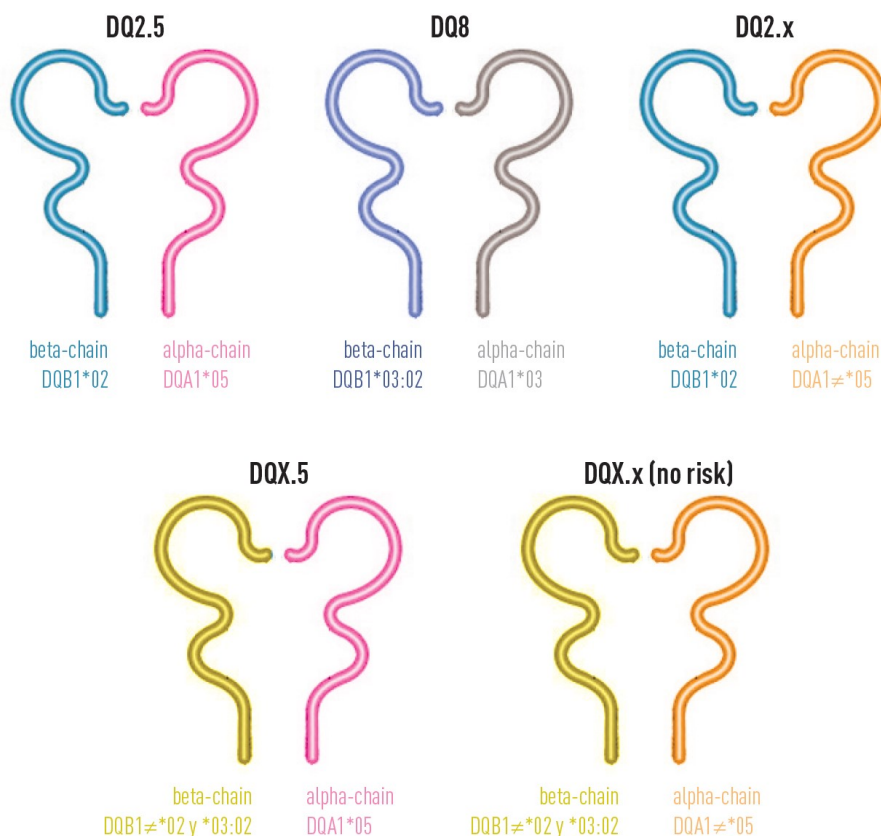
Zbývající pacienti (5-10%) jsou obvykle nosiči druhého heterodimeru HLADQ8 (nejběžnějšího u domorodých Jihoameričanů), kódované alelami DQA1*03:01 a DQB1*03:02 nebo jsou nosiči pouze jedné z dalších alel, které kódují HLADQ2 (DQA1*05 nebo DQB1*02) [5, 9, 11-13].

Následující tabulka ukazuje HLA haplotypy, které tvoří antigeny HLA-DQ2 a HLA-DQ8. (DQB1 a DQA1 kódující α a β řetězce antigenu a asociované DRB1 alely).

| HLA-DQ | Serological equivalent | Genotype | | | | | | Frequency in celiac patients |
|--------|------------------------|-------------|-------|-------|-------------|-------|-------|----------------------------------|
| | | Haplotype 1 | | | Haplotype 2 | | | |
| | | DQB1* | DQA1* | DRB1* | DQB1* | DQA1* | DRB1* | |
| DQ2 | DQ2.5 cis heterozygous | 02:01 | 05:01 | 03 | - | - | - | More than 90% of celiac patients |
| | DQ2.5 cis homozygous | 02:01 | 05:01 | 03 | 02:01 | 05:01 | 03 | |
| | DQ2.5 cis + DQ2-2 | 02:01 | 05:01 | 03 | 02:02 | 02:01 | 07 | |
| | DQ2.5 trans | 03:01 | 05:05 | (11) | 02:02 | 02:01 | 07 | |
| | DQX.5 | 03:01 | 05:05 | (11) | - | - | - | |
| | DQ2.2 | 02:02 | 02:01 | 07 | - | - | - | |
| DQ8 | DQ8 | 03:02 | 03:01 | (04) | - | - | - | 2-10% of patients |

Tabulka 1: Založená na odkazech 3 a 4.

Obr. 1 shrnuje různé HQ heterodimery s alelami, které vykazují predispozici k onemocnění celiakií.



Obrázek 1 CD (onemocnění celiakie) a rizikové DQ heterodimery kódované různými kombinacemi DQA1 a DQB1 alel.

Prevalence onemocnění byla podhodnocena. Časná diagnostika je důležitá pro nasazení bezlepkové diety. Bez léčby je možné, že přejde do dalších autoimunitních projevů jako jsou diabetes 1. typu nebo revmatická artritida.

Princip metody

Detekční metodou, na které je Genvinset® založen, je technologie tří Real-Time PCR amplifikací monitorované pomocí TaqMan® prób.

Genvinset® HLA Celiac Plus kit obsahuje čtyři PCR reakce se specifickými primery pro alely DQB1*02, DQB1*03:02, DQA1*05 a DQA1*03 (*)

Detekce alel, které jsou predispozičními faktory onemocnění celiakie umožňují také určení haplotypu.

Současně metoda amplifikuje a detekuje kontrolní gen (β -globin) v reakcích 2, 3 a 4 (není nutné v reakci 1) pro verifikaci výsledků testu.

(*) Ví omezení metody (strana 22)

Obsah soupravy

Referenční číslo DQP-48 (48 testů)

- GVS DQP-PM1: 2 lahvičky x 110 µl Primer Mix (PM1)
- GVS DQP-PM2: 2 lahvičky x 110 µl Primer Mix (PM2)
- GVS DQP-PM31: 2 lahvičky x 110 µl Primer Mix (PM3)
- GVS DQP-PM41: 2 lahvičky x 110 µl Primer Mix (PM4)
- GVS DQP-MM1: 2 lahvičky x 156 µl Master Mix (MM1)
- GVS DQP-MM2: 2 lahvičky x 156 µl Master Mix (MM2)
- GVS DQP-MM3: 2 lahvičky x 156 µl Master Mix (MM3)
- GVS DQP-MM4: 2 lahvičky x 156 µl Master Mix (MM4)
- GVS-DQP-C: 1 lahvička x 20 µl Pozitivní kontrola (C+)
- GVS-RB: 1 lahvička x 100 µl Reakční blank (RB)

Referenční číslo DQP-24 (24 testů)

- GVS DQP-PM1: 1 lahvička x 110 µl Primer Mix (PM1)
- GVS DQP-PM2: 1 lahvička x 110 µl Primer Mix (PM2)
- GVS DQP-PM31: 1 lahvička x 110 µl Primer Mix (PM3)
- GVS DQP-PM41: 1 lahvička x 110 µl Primer Mix (PM4)
- GVS DQP-MM1: 1 lahvička x 156 µl Master Mix (MM1)
- GVS DQP-MM2: 1 lahvička x 156 µl Master Mix (MM2)
- GVS DQP-MM3: 1 lahvička x 156 µl Master Mix (MM3)
- GVS DQP-MM4: 1 lahvička x 156 µl Master Mix (MM4)
- GVS-DQP-C: 1 lahvička x 20 µl Pozitivní kontrola (C+)
- GVS-RB: 1 lahvička x 100 µl Reakční blank (RB)

Skladování soupravy

Pro správné provedení testu musí být všechny reagensie uchovávány při teplotě -18 až-30 °C. Při této teplotě jsou reagensie stabilní do data expirace vyznačené na lahvičce. Neprovádějte více než 3 zmrazovací / rozmrazovací cykly lahviček Primer Mixu (GVS DQP) a Master Mixu (GVS DQP-MM), neboť tím může být snížena senzitivita a změněny výsledky

Z důvodů fotosenzitivity reagensií, zabraňte stálé expozici světlu.

Materiál potřebný, který není součástí soupravy

Obecně

- Rukavice
- Laboratorní plášť

Spotřební materiál

- Filtrační špičky
- 1,5 ml autoklávované zkumavky
- RT-PCR reagentie specifické pro přístroj
(např. když pro Rotor Gene-Q lze použít pouze 0,1 ml zkumavky)

Vybavení

- RT-PCR přístroj s detekčními kanály FAM a HEX/VIC
Byly validovány následující přístroje:
 - - StepOne™, Applied Biosystems™
 - - 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems™
 - - LightCycler® 96 System, Roche
 - - LightCycler® 480, Roche
 - - CFX96™
- Vortex
- Pipety

Odběr vzorku a příprava

Pro testování používejte vzorek plné krve v EDTA nebo citrátu jako antikoagulantu. Heparin může interferovat s PCR procesem a neměl by být pro tuto metodu používán.

Metoda je kompatibilní se všemi konvenčními DNA extrakčními systémy. Před vydáváním výsledků pro diagnostické účely proveďte validační test vaší extrakční soupravou.



Pozor

Všechny biologický materiál a vzorky krve by měly být pokládány za infekční materiál a jako s takovými je třeba s nimi zacházet. Při manipulaci s nimi dodržujte základní (obecná) opatření. Každá manipulace by se měla provádět v rukavicích s příslušnou ochranou.

Pracovní postup

A) Příprava PCR



Upozornění

- Před začátkem postupu rozmrazte všechny součásti soupravy, promíchejte a centrifugujte.
- Pracujte na ledu nebo chladícím bloku.
- PCR by měla být prováděna v Pre PCR prostoru.
- Používejte pouze špičky s filtrem a autoklávované zkumavky 1,5 ml.
- Po celou dobu používejte rukavice a laboratorní plášť.
- Doporučuje se v každém běhu začlenit kontrolu kontaminace (Reagenční blank (RB) a , pozitivní kontrolu (GVS-DQP-C+) obě obsažené v soupravě.

1. Rozmrazte vzorky. Vortexujte (nebo jemně poklepejte prstem).
2. Připravte následující směsi pro všech Primer Mixů (PM1, PM2, PM3 a PM4) s jejich odpovídajícími Master Mixy (MM1, MM2, MM3 a MM4 pro (n+1) vzorků.

| | Vol. per sample (µL) |
|-------------------------|----------------------|
| Master Mix 1, 2, 3 or 4 | 5 |
| Primer Mix 1, 2, 3 or 4 | 4 |

3. Pipetujte 9 µl této směsi do každé jamky a přidejte 1 µl DNA vzorku, pozitivní kontroly nebo Reakčního blanku do odpovídající jamky.

4. Uzavřete destičku nebo zkumavku a krátce centrifugujte, aby kapalina byla na dně jamky.
5. Umístěte destičku do termocykleru a spusťte následující program.

B) Nastavení termocykleru

1. Nastavte amplifikační program:

| | Cycle Number | Temperature (°C) | Time (mm:ss) | Ramp (%) | Analysis |
|------------------|--------------|------------------|--------------|----------|----------|
| Denaturalization | 1 | 95 | 05:00 | 100 | X |
| Cycles | 40 | 95 | 00:15 | 100 | X |
| | | 64 | 1:00 | 100 | Single |
| Cooling | 1 | 15 | ∞ | 100 | X |

2. Nastavte odečítací kanály

Emitovaná fluorescence musí být v kanálech FAM (495-520 nm) a HEX (535-554 nm). Obě fluorescence by měly být detekovány v každé jamce (biplex reakce).

Výsledky

GENVINSET HLA CELIAC PLUS je kvalitativní metodou, ve které identifikujeme přítomnost nebo nepřítomnost alel HLA DQB1*02, DQB1*03:02, DQA1*05 a DQA1*03 .

Přítomnost kterékoliv z alel asociovaných s celiakií bude stanovena určením positivity nebo negativity čtyř testovacích reakcí. V případě DQB1*02 je pozitivita reakce prokázána v kanálu FAM pokud je přítomná alespoň jedna. Pozitivní reakce na kanálu HEX značí přítomnost alespoň jedné alely jiné než *02.

Pro testování každého vzorku je potřeba nakonfigurovat destičku tak, aby každému vzorku příslušely čtyři jamky pro každý typ reakce(1, 2, 3 a 4). Nastavte 6 měřících kanálů a jejich cílů podle následující tabulky:

| Target Name | Reporter |
|-------------|-----------|
| b-globin | HEX / VIC |
| DQB1*02 | FAM |
| No DQB1*02 | HEX/VIC |
| DQA1*05 | FAM |
| DQB1*03:02 | FAM |
| DQA1*03 | FAM |

Není třeba volit pasivní referenci.

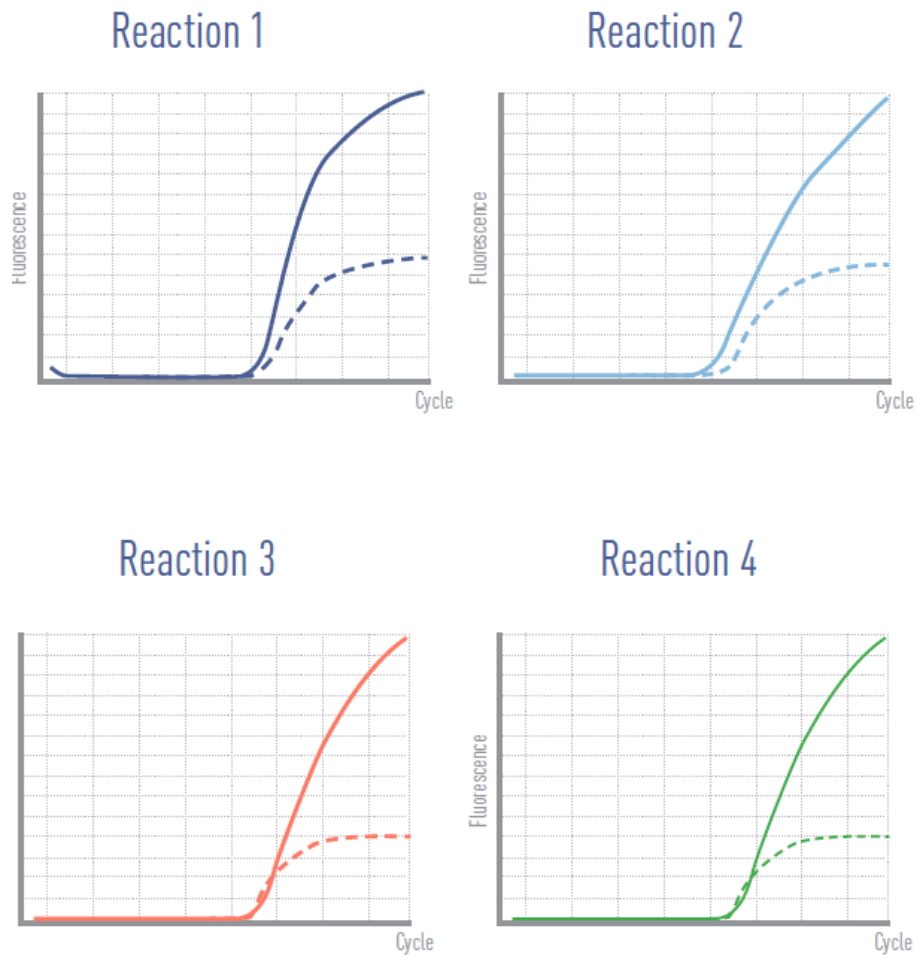
Pro každou výše zmíněnou reakci je třeba zobrazit dva kanály.

V reakci 1, když se objeví amplifikační křivka pouze v FAM jedná se o homozygotní DQB1*02 a může být charakterizována číslem zvaným crossing point (Cp) odpovídajícím cyklu, ve kterém byla poprvé detekována pozitivní fluorescence. Pokud se objeví pouze jedna amplifikační křivka v HEX kanálu, vzorek je negativní pro DQB1*02. V případě, že se objeví křivka v obou kanálech FAM i HEX, obsahuje vzorek DQB1*02 alelu alelu DQB1jinou než DQB1*02, vzorek je heterozygotní.

V reakci 2, vzorky s amplifikační křivkou v kanálu FAM obsahují DQA1*05. Obdobně v **reakci 3** je v kanálu FAM pozitivní DQB1*03:02 a v **reakci 4** DQA1*03.

β -globin slouží jako kontrolní gen a tudíž se musí objevit v reakcích 2,3,4
 Vzorky generující amplifikační křivky v kanálu HEX/VIC jsou pozitivní pro interní kontrolu (β -globin) slouží pro validaci výsledku. Je třeba respektovat pravidla v odstavci „Kontrola kvality“ (strana 17)

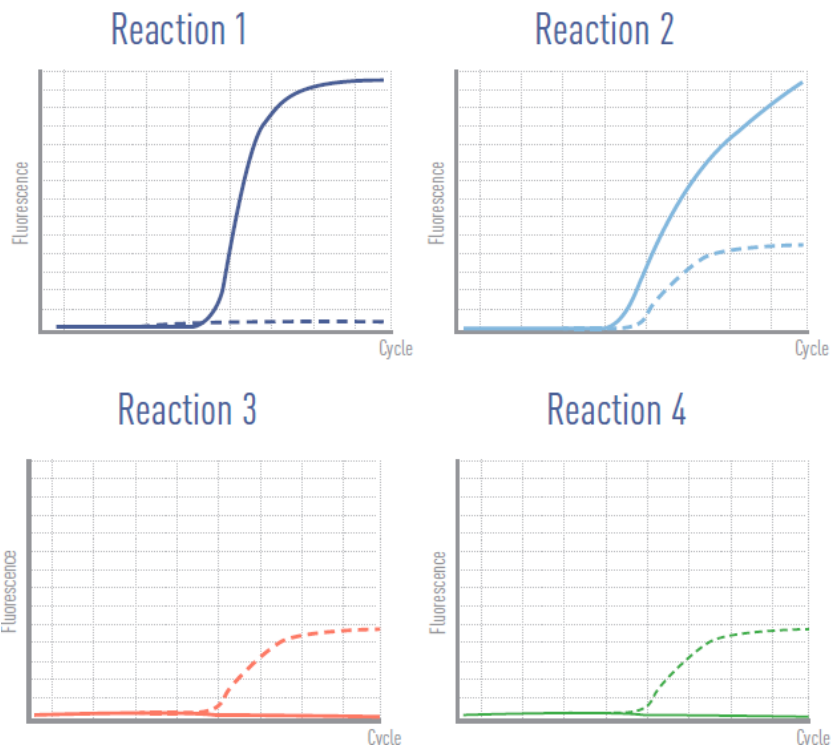
Obrázky 2 až 6 ukazují očekávané výsledky pro různé typy vzorků



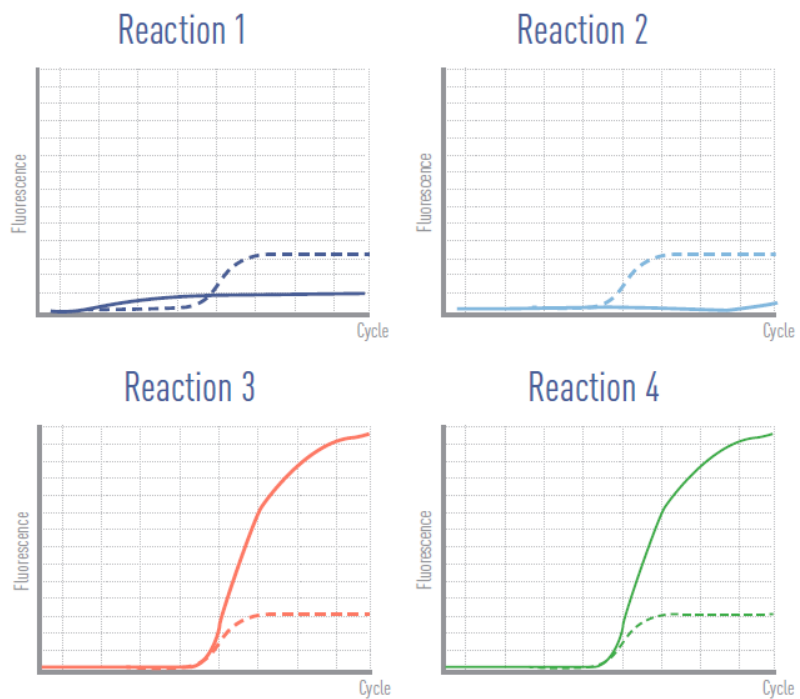
Obrázek 2. DQ2.5 heterozygot +DQ8



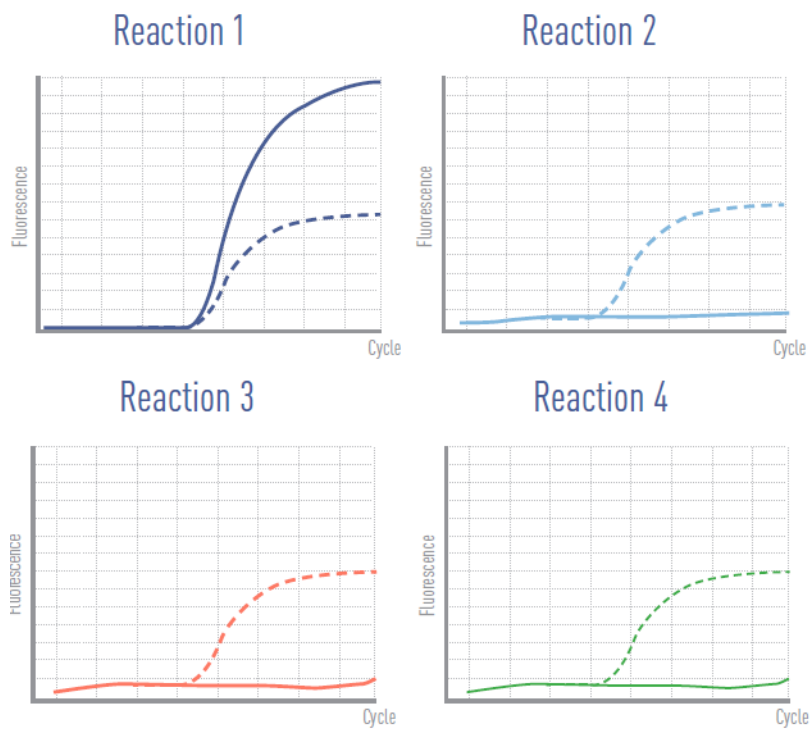
Výsledky této metody mohou vypadat následovně:



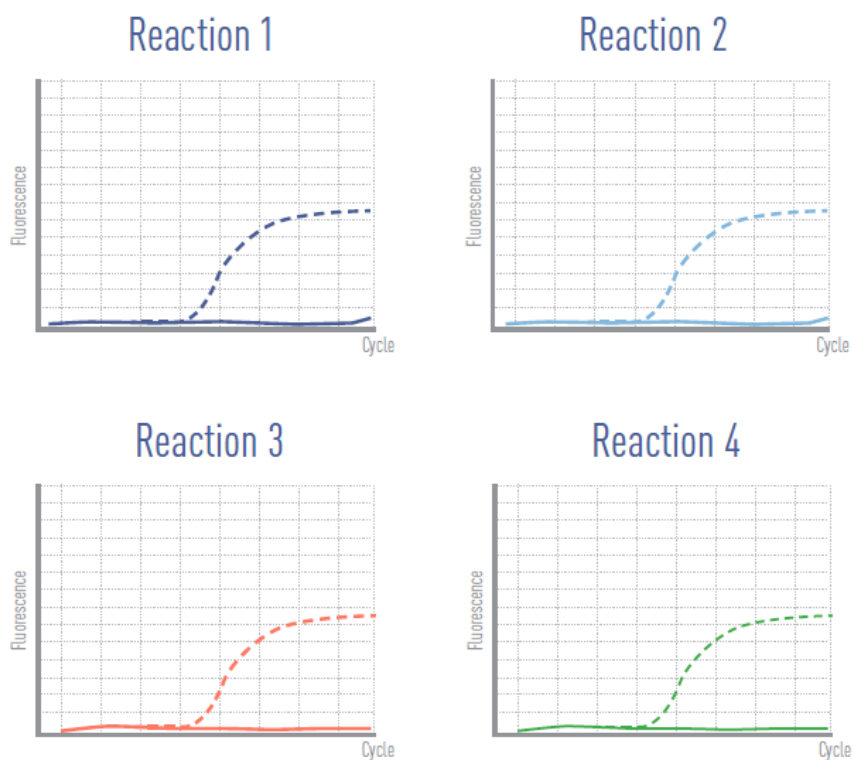
Obrázek 3. DQ2.5 homozygotní



Obrázek 4. DQ8 pozitivní



Obrázek 5. DQ2.x heterozygotní



Obrázek 6. DQ2/DQ8 negativní

Kontrola kvality

V důsledku kvalitativní povahy testu není třeba provádět kalibraci.

Doporučuje se v každém běhu začlenit kontrolu kontaminace, použitím Reagenčního Blanku místo DNA v soupravě a také dodávanou (pozitivní kontrolu (vzorek typu DQB1*02/03/02 a DQA1*03/02) obsaženou v soupravě.

Aby bylo možno prohlásit vzorek validním, je třeba si uvědomit následující kritéria:

- Kontrola kontaminace (reakční blank) musí být negativní pro DQB1*02 / DQB1*03:02 / DQA1*05 / DQA1*03 a pro β -globin. Hodnoty $C_p > 35$ by měly být pokládány za negativní. $C_p < 35$ svědčí o kontaminaci a výsledky by měly být zlikvidovány.
- Pozitivní kontrola vzorku (musí být pozitivní jak pro DQB1*02 / DQB1*03:02 / DQA1*05 / DQA1*03 a pro β -globin.
- Vzorky DNA by měly být vždy pozitivní pro β -globin ($C_p < 35$).
- Vzorky, vykazující výsledky $C_p > 35$ pro β -globin a pro DQB1*02 / DQB1*03:02 / DQA1*05 / DQA1*03 a musí být pokládány za pochybné a měly by být přetestovány za provedení nové extrakce DNA.

Stanovení je třeba provádět podle doporučení v soupravě stejně jako dalších kontrol kvality, které odpovídají lokálním, národním specifikacím certifikačních agentur.

Specifická operační data

1. Analytická specifická

Bylo prokázáno, že navázání primerů a prób v převážné většině alel HLA databáze (IMGT-HLA) nevykazuje nespecifické vazby. Nebyl hlášen žádný případ cross-reakčního fenoménu u genomické DNA.

Specifická analytických reakcí je uvedena v Odstavci „Detekované alely GenVinSet® HLA CELIAC PLUS“, strana 20-21.

2. Analytická senzitivita

Byla provedena diluční stanovení dvou vzorků několika vzorků s pozitivními i negativními typy DQB1*02/03:02 and DQA1*05/03 získanými pomocí konvenčních izolačních systému a byly získány následující výsledky pro analytickou senzitivitu:

- Reakce 1 – Detekce DQB1*02: Limit detekce = 0,8 ng/uL
- Reakce 2 – Detekce DQA1*05: Limit detekce = 0,8 ng/uL
- Reakce 3 – Detekce DQB1*03:02: Limit detekce = 2,5 ng/uL
- Reakce 4 – Detekce DQA1*03: Limit detekce = 0,25 ng/uL

Vzorek DNA získaný konvenčním extrakčním systémem:

Limit detekce = 2,5 ng/μl (*)

(*) Cp <35

3. Diagnostická senzitivita a specifická

V několika studiích lidské genomové DNA prováděných v externích laboratořích bylo analyzováno 130, 101 a 89 a 153 vzorků dříve typovaných HLA-DQB1 a DQA1 lokusů metodami HLA-SSO nebo NGS.

Všechny vzorky bylo možno hodnotit (pozitivní kontrola - β-globin).

Celkem 14 vzorků bylo homozygotních pro DQB1*02 alelu ; 56 bylo heterozygotních a 60 bylo negativních pro tuto alelu.

Pro další reakce (2, 3 a 4) pozitivní výsledky byly získány pro odpovídající alely v 51, 27 a 44 vzorcích.

GenVInSet
HLA CELIAC PLUS

| | | Reaction 1 | | |
|-----|---------------|------------|--------------|----------|
| SSO | Samples | Homocygous | Heterocygous | Negative |
| | Homozygous. | 14 | 0 | 0 |
| | Heterocygous. | 0 | 56 | 0 |
| | Negative. | 0 | 0 | 60 |

| | | Reaction 2 | | Reaction 3 | | Reaction 4 | |
|--------------|---------|------------|------|------------|------|------------|------|
| SSO / NGS | Samples | Pos. | Neg. | Pos. | Neg. | Pos. | Neg. |
| | Pos. | 51 | 0 | 27 | 0 | 44 | 0 |
| | Neg. | 0 | 50 | 0 | 62 | 0 | 109 |

Došlo ke 100 % shodě výsledků získaných pomocí soupravy Genvinset® HLA CELIAC PLUS s informacemi z typizací metodami SSO a NGS.

Alely detekované GENVINSET® HLA CELIAC PLUS kit (IMGT-HLA 3.37.0)

| Reaction 1 | Reaction 2 | Reaction 4 |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>DQB1*02:01:01</i> | <i>DQA1*05:01:01:01</i> | DQA1*03:01:03 |
| <i>DQB1*02:02:01</i> | DQA1*05:01:01:02 | DQA1*03:01:04 |
| DQB1*02:02:04 | DQA1*05:01:01:03 | DQA1*03:01:05 |
| DQB1*02:53Q | <u>DQA1*05:01:02</u> | <i>DQA1*03:02:01:01</i> |
| DQB1*02:62 | <u>DQA1*05:02</u> | DQA1*03:02:01:02 |
| DQB1*02:79 | <u>DQA1*05:03:01:01</u> | <i>DQA1*03:03:01:01</i> |
| DQB1*02:80 | <u>DQA1*05:03:01:02</u> | DQA1*03:03:01:02 |
| DQB1*02:81 | <u>DQA1*05:04</u> | DQA1*03:03:01:03 |
| DQB1*02:82 | <i>DQA1*05:05:01:01</i> | DQA1*03:03:01:04 |
| DQB1*02:83 | DQA1*05:05:01:02 | DQA1*03:03:01:05 |
| DQB1*02:84 | DQA1*05:05:01:03 | DQA1*03:03:01:06 |
| DQB1*02:96N | DQA1*05:05:01:04 | DQA1*03:03:01:07 |
| | DQA1*05:05:01:05 | DQA1*03:03:02 |
| | DQA1*05:05:01:06 | DQA1*03:03:03 |
| | DQA1*05:05:01:07 | DQA1*03:04 |
| | DQA1*05:05:01:08 | <u>DQA1*03:05</u> |
| | DQA1*05:05:01:09 | DQA1*03:06 |
| | DQA1*05:05:01:10 | DQA1*03:07 |
| | <u>DQA1*05:06:01:01</u> | DQA1*03:08 |
| | <u>DQA1*05:06:01:02</u> | DQA1*03:09 |
| | <u>DQA1*05:07</u> | <u>DQA1*03:10</u> |
| | DQA1*05:08 | |
| | <i>DQA1*05:09</i> | |
| | DQA1*05:10 | |
| | DQA1*05:11 | |

- Detekované alely
- [Netestované alely](#)
- [Nedetekovatelné alely](#)
- *CWD alely značené tučně a kurzívou*

Alely detekované GENVINSET® HLA CELIAC PLUS kit (IMGT-HLA 3.37.0)

Reaction 3

| | | |
|-----------------------------|--------------------|---------------------|
| <i>DQB1*03:02:01</i> | DQB1*03:08 | DQB1*03:221 |
| DQB1*03:02:02 | DQB1*03:106 | <u>DQB1*03:223</u> |
| <u>DQB1*03:02:03</u> | DQB1*03:107 | DQB1*03:224 |
| DQB1*03:02:04 | DQB1*03:11 | <u>DQB1*03:225</u> |
| DQB1*03:02:05 | <u>DQB1*03:110</u> | DQB1*03:228 |
| DQB1*03:02:06 | DQB1*03:125 | <u>DQB1*03:229</u> |
| <u>DQB1*03:02:07</u> | DQB1*03:146 | <u>DQB1*03:233</u> |
| DQB1*03:02:08 | DQB1*03:161 | <u>DQB1*03:237N</u> |
| DQB1*03:02:09 | DQB1*03:174 | DQB1*03:240 |
| <u>DQB1*03:02:10</u> | DQB1*03:175 | DQB1*03:245 |
| DQB1*03:02:11 | DQB1*03:178 | DQB1*03:247 |
| DQB1*03:02:12 | DQB1*03:179 | DQB1*03:251 |
| <u>DQB1*03:02:13</u> | <u>DQB1*03:18</u> | DQB1*03:261 |
| <u>DQB1*03:02:14</u> | DQB1*03:184 | DQB1*03:263 |
| DQB1*03:02:15 | DQB1*03:185 | DQB1*03:269N |
| DQB1*03:02:16 | DQB1*03:189 | DQB1*03:32 |
| DQB1*03:02:17 | DQB1*03:190 | <u>DQB1*03:37</u> |
| DQB1*03:02:18 | DQB1*03:199 | DQB1*03:45 |
| DQB1*03:02:19 | DQB1*03:203 | <u>DQB1*03:62</u> |
| DQB1*03:02:20 | <u>DQB1*03:204</u> | DQB1*03:63 |
| DQB1*03:02:21 | DQB1*03:205 | DQB1*03:64 |
| <u>DQB1*03:02:22</u> | DQB1*03:210 | DQB1*03:66N |
| DQB1*03:02:23 | DQB1*03:211 | DQB1*03:67 |
| DQB1*03:02:24 | DQB1*03:213N | DQB1*03:68 |
| DQB1*03:02:25 | DQB1*03:214 | DQB1*03:70 |
| DQB1*03:02:26 | DQB1*03:215 | <u>DQB1*03:81</u> |
| DQB1*03:07 | DQB1*03:220 | DQB1*03:85 |

- Detekované alely
- Netestované alely.
- Nedetekovatelné alely.
- ***CWD alely značené tučně a kurzív***

Omezení metody

- Přítomnost mutací nebo polymorfismů na primeru / sondách v annealing-místech jsou možné a mohou mít za následek nedostatečnou definici alely. K vyřešení typizace by mohly být nezbytné alternativní technologie.
- Všechny předepsané podmínky PCR by měly být přísně kontrolovány. Jakékoliv odchylky od těchto parametrů mohou vést k pochybným výsledkům.
- Práce s GENVINSETem musí být prováděna v souladu se správnou laboratorní praxí a lokálními nařízeními, jako EFL standardy (European Federation of Immunogenetics).
- qRT-PCR termocykler musí být kalibrován v souladu s doporučeními výrobce a měl by být používán podle návodu výrobce.
- Nekombinujte složky z jiných souprav nebo šarží.
- Nepoužívejte soupravu po datu expirace.
- Nepoužívejte soupravu, pokud máte podezření na ztrátu reaktivity, kontaminaci, protržení kontejneru nebo další případy, které mohou ovlivnit kvalitu testu.
- Z důvodu komplexnosti typizace HLA by měla kontrolovat data a interpretaci kvalifikovaná osoba.
- Prošlé reagentie likvidujte podle aktuálních nařízení.

ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

Problém

- Pravděpodobná příčina
 - Doporučená opravná opatření

Kontrola kontaminace -reakční blank (RB) je pozitivní

- **Kontaminace Primer Mixu/ Master Mixu/Reakčního blanku**
 - Opakujte experiment s novým alikvotem Primer Mixu/Master Mixu/Reakčního blanku.
 - Manipulaci se soupravou provádějte vždy v souladu se správnou laboratorní praxí, aby nedošlo ke kontaminaci.
 - Verifikujte podmínky manipulace a skladování.
 - Zlikvidujte kontaminované reagenty.
- **Pre PCR oblast je kontaminovaná**
 - Ověřte, že všechna nutná opatření v laboratoři jsou dodržována.
 - Ověřte možné kontaminace v jiných PCR metodách.
 - Ověřte kvalitu použitého materiálu (pipety, špičky, zkumavky).
 - Ověřte, že není kontaminovaná Taq polymeráza.
- **Chyba v pipetování**
 - Vždy ověřujte, že přidaný materiál odpovídá pracovnímu listu.

Nízký nebo žádný signál u všech vzorků. Kontrolní vzorky jsou v pořádku.

- Špatná kvalita DNA vzorků
 - Opakujte DNA extrakci.
- Vzorky s nízkou koncentrací DNA
 - Ověřte koncentraci DNA.

Příliš nízká intenzita fluorescence.

- **Degradace soupravy (lahvička Primer Mixu)**
 - Ověřte správné skladování (Primer Mixu v temnu, při -18 až -30°C).
 - Zabraňte více než 3 cyklům zmrazování rozmrazování Primer Mixu.
 - Je-li třeba, připravte si alikvoty.

- Opakujte série s novými reagensiemi.
- **Degradace soupravy (lahvička Master Mixu)**
 - Ověřte správné skladování (Master Mixu při -18 až -30°C).
 - Zabraňte více než 3 cyklům zmrazování /rozmrazování Master Mixu .

Negativní kontrolní vzorek je pozitivní

- **Zkřížená kontaminace**
 - S komponenty soupravy pracujte s největší možnou opatrností zabránit kontaminaci.
- **Chyba pipetování**
 - Ujistěte se, že přidáný vzorek odpovídá protokolu.

Pozitivní kontrolní vzorek je negativní

- **Chyba pipetování**
 - Ujistěte se, že přidáný vzorek odpovídá protokolu.

Mění se intenzita fluorescence

- **Vnější prach interferuje se signálem**
 - Manipulujte s kapilárami vždy v rukavicích.
- **Kapalina není na dně jamky nebo je tam vzduchová bublina**
 - Centrifugujte pro jistotu, že vzorek je na dně jamky/zkumavky a nejsou tam vzduchové bubliny, jak je v protokolu.
- **Chyba pipetování**
 - Ověřte, že v jamce/kapiláře je správný objem vzorku.

Není fluorescenční signál

- **Vybrán špatný odečítací kanál**
 - Nakonfigurujte správný kanál.
- **Chyba pipetování nebo nepřítomnost reagensie**
 - Ověřte pipetování a konfiguraci reakce.
 - Opakujte PCR.
- **Nebyl vybrán odečítací kanál v programu termocykleru**
 - Ověřte, a modifikujte program termocykleru.

Odkazy

1. Sollid LM. *Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. Nature Rev Immunol* 2002; 2: 647-55.
2. Sollid LM. *Molecular basis of celiac disease. Annu Rev Immunol* 2000; 18: 53-81.
3. Louka AS and Sollid LM. *HLA in coeliac disease: Unravelling the complex genetics of a complex disorder. Tissue Antigens* 2003; 61: 105-117.
4. Dubois PC and van Heel DA. *Translational Mini-Review Series on the Immunogenetics of Gut Disease: Immunogenetics of coeliac disease. Clin Exp Immunol.* 2008; 153(2):162-73.
5. *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease.* Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Leigeman M, Mäki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP. *JPGN* 2012;54:136-160.
6. *Real-Time PCR Using Fluorescent Resonance Emission Transfer Probes for HLA-B Typing.* Rosa Faner, Natàlia Casamitjana, Jordi Coll, Pepi Caro, Ricardo Pujol-Borrell, Eduard Palou and Manel Juan. *Human Immunology* 67, 374–385 (2006).
7. *Determination of the HLA DQ2 and DQ8 genotype using a four amplification tubes approach: real time PCR with FRET hybridisation probes.* Rosa Faner, Estibaliz Ruiz, Eva Campos, Maria Jose Herrero, Ricardo Pujol-Borrell, Manel Juan, Eduard Palou. *Congrés: 22th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (Toulouse, France, 2008)*
8. *Determinación del genotipo HLA-DQ2/DQ8 por PCR a tiempo real.* Rosa Faner, Estibaliz Ruiz, Eva Campos, Ricardo Pujol-Borrell, Manel Juan, Eduard Palou. *XXXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología, 21-24 Mayo 2008, Palacio de Congresos. Pueblo Español. Palma de Mallorca. Poster*

9. *Human leukocyte antigen-DQ2 homozygosity and the development of refractory celiac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma. Al-Toma A, Goerres MS, Meijer JW, Pena AS, Crusius JB, Mulder CJ. Clin Gastroenterol Hepatol. 2006;4:315–319.*
10. *Late Breaking Abstracts Submitted to DDW 2007.*
11. *HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. Megiorni F, Pizzuti A. Journal of Biomedical Science 2012, 19:88.*
12. *The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. Vader W, Stepniak D, Kooy Y, Mearin L, Thompson A, van Rood JJ, Spaenij L, Koning F. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Oct 14;100(21):12390-5. Epub 2003 Oct 6.*
13. *Appropriate clinical use of human leukocyte antigen typing for coeliac disease: an Australasian perspective. Tye-Din JA, Cameron DJS, Daveson AJ, Day AS, Dellsperger P, Hogan C et al. Intern Med J. 2015 Apr;45(4):441-50.*

Poznámky odběrateli

- Tento výrobek byl vyvinut pro *in vitro diagnostiku*
- Výrobky firmy BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L. by neměly být přeprodávány modifikovány nebo používány pro výrobu komerčních produktů bez písemného souhlasu BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.
- Všechny informace v tomto dokumentu mohou být změněny bez předchozího upozornění. BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L. nepřebírá zodpovědnost za možné chyby v tomto dokumentu. Předpokládá se, že dokument je kompletní a přesný v době publikace. V žádném případě není BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L., zodpovědná za nehody, mimořádné nebo několikanásobné škody vzniklé použitím tohoto dokumentu.
- Koupí tohoto produktu získáváte právo využívat některé patenty Roche za účelem využití jako *in vitro diagnostiku*. To nezaručuje žádný generický patent nebo další patenty sloužící k jinému účelu než výše specifikované.
- FAM[™] a HEX[™] jsou obchodní značky Life Technologies Corporation.
- VIC[®] je obchodní značka Life Technologies Corporation.
- FAM[™] HEX[™] a VIC[®] mohou být pokryty více patenty vlastněnými Applied Biosystems, LLC. Koupě tohoto výrobku zahrnuje omezená nepřenositelná práva.
- TaqMan[®] je registrovaná značka Roche Molecular Systems, Inc.
- GENVINSET je obchodní značka BLACKHILLS DIAGNOSTIC RESOURCES, S.L.

Změny oproti verzi 01

| Verze | Popis modifikace |
|--------------|--|
| Rev. 02 | Přidání přístroje CFX96 qPCR k listu validovaných termo-cyklerů. |

Vysvětlení symbolů na nálepkách



Pro *in vitro* diagnostické použití



Tento výrobek splňuje požadavky Evropské Direktivy 98/79/EC pro *in vitro* diagnostické zdravotnické prostředky



Katalogové číslo



Šarže



Datum expirace



Obsah stačí pro <n> testů



Výrobce



Skladujte při/ omezení teploty



Chraňte před sluncem



Pozitivní kontrola